

УДК 633.358:[579.841'31+579.842.16

ЭФФЕКТИВНОСТЬ ИНОКУЛЯЦИИ ГОРОХА СИМБИОТИЧЕСКИМИ И АССОЦИАТИВНЫМИ ДИАЗОТРОФАМИ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ РАЗЛИЧНЫХ ДОЗ МИНЕРАЛЬНОГО АЗОТА

С.А. ПОТАПОВА, Х. ПЕШКЕ, Ш. МОЛЛЕНХАУЭР, В.Т. ЕМЦЕВ, В.А. ЧЕРНИКОВ

(Кафедры экологии и микробиологии ТСХА, Университет им.
Гумбольдта, Берлин, Германия)

На примере гороха изучено влияние симбиотических *Rhizobium* и ассоциативных *Pseudomonas* и *Klebsiella* diaзотрофов на урожай и вынос азота растениями в зависимости от доз минерального азота.

Исследования проводили на дерново-подзолистой легкосуглинистой почве в условиях вегетационных опытов на базе Университета им. Гумбольдта (Берлин).

Установлено положительное влияние на растения diaзотрофов, особенно применения комплекса симбиотических и ассоциативных микроорганизмов, эффект от которых почти в 2 раза превышает действие достаточно высокой дозы минерального азота (80 кг/га). Эффект нитрагинизации снижается при внесении минерального азота.

Полученные результаты могут найти применение при решении вопросов охраны окружающей среды и экономии материальных ресурсов.

В условиях современного земледелия резко ограничилось применение минеральных удобрений и химических средств защиты растений, что вызвано, с одной стороны, рыночными отношениями, а с другой — опасностью загрязнения окружающей среды. Так, использование растениями азота из минеральных удобрений составляет около 40% [6], а затраты на производство и внесение их оцениваются в 35—42% общего

энергопотребления в сельском хозяйстве [16, 19]. Между тем обеспеченность растений азотом является основой полноценного урожая, поэтому необходимо восполнение элементов азотного питания и защиты растений за счет использования воспроизводимых ресурсов биологических сообществ.

Формирование таких сообществ в значительной степени основано на взаимодействии расте-

ний с почвенными микроорганизмами, которые поселяются на поверхности корней или проникают в растительные ткани, обеспечивая растения необходимым азотом. При этом почвенные микроорганизмы снабжают растения не только азотом, но и синтезируют фитогормоны и витамины, снижают численность и подавляют активность фитопатогенов [2].

Признавая «вклад» биологического азота, следует отметить, что эффективность азотфиксации зависит от ряда экологических факторов, одним из которых является минеральный азот. Вместе с тем в литературе имеются противоречивые данные относительно влияния разных доз химического азота на процесс азотфиксации.

Широко распространено мнение о торможении минеральным азотом процесса азотфиксации [11, 14]. В то же время имеются данные [3, 6, 20], что дозы азотных удобрений, обычно применяемые в сельскохозяйственной практике (100—150 кг/га), вызывают лишь кратковременное подавление азотфиксации, а существенное торможение наблюдается лишь при высоких дозах связанного азота (от 500 до 1000 кг/га).

Некоторые исследователи считают, что бобовым минеральный азот не нужен и даже вреден, так как ухудшает качество продукции и снижает урожай [1].

Другие придерживаются мнения о необходимости небольших «стартовых» доз (15—30 кг/га), поскольку они способствуют увеличению листовой поверхности растений, что, в свою очередь, обес-

печивает лучшее снабжение клубеньков углеводами. При этом повышается продуктивность растений и не снижается количество фиксированного азота [4, 5, 8, 13].

Более детальные исследования данного вопроса, проведенные с различными бобовыми (горохом, кормовыми бобами, люпином), выявили высокую чувствительность клубеньковых бактерий к азоту минеральных удобрений уже при дозах 20—30 кг/га, а дозы азота 30—100 кг/га и более угнетали симбиоз всех бобовых культур, задерживали образование клубеньков и сокращали продолжительность активного симбиоза [10].

Связанный азот ингибирует практически все стадии образования и функционирования азотфиксирующей системы, при этом наблюдается нарушение процесса взаимодействия трифоллина с поверхностью *Rhizobium trifolii* [16], уменьшение массы клубеньков гороха и снижение скорости их роста [17].

Определенное значение имеют и культуры микроорганизмов, составляющие комплекс с растениями. В настоящее время в качестве дiazотрофов-комплексобразователей используют бактерии родов *Rhizobium*, *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Klebsiella* и др., активность которых также связана с рядом экологических факторов [9, 15, 18]. Причем положительный эффект достигается от применения 2—3 штаммов азотфиксирующих микроорганизмов [9, 18].

Однако, несмотря на достаточно широкое использование бактериальных инокулянтов в указан-

ных целях, вопрос о характере воздействия и дозах минерального азота, депрессирующего функционирование азотфиксирующих систем, остается недостаточным изученным, а полученные данные имеют неоднозначный характер. Поэтому целью настоящей работы явилось изучение влияния различных доз минерального азота на эффективность инокуляции гороха симбиотическими *Rhizobium* и ассоциативными diaзотрофами *Pseudomonas* и *Klebsiella*.

Методика

Объектами исследования были растения гороха посевного сорта Прогресс 7, выращенные в условиях двух вегетационных опытов на базе Университета им. Гумбольдта (Германия) при различных дозах азота и одновременной инокуляции растений симбиотическими бактериями *Rhizobium leguminosarum* штамм Pis 4 и ассоциативными diaзотрофами *Klebsiella planticola* штамм ТСХА-91 и *Pseudomonas* sp штамм PsIA₁₂ отдельно и в комплексе.

Схема опытов включала следующие варианты:

Опыт 1: I — контроль; II — N — 20 кг/га (в дальнейшем 20N); III — *Rhizobium*; IV — 20N + *Rhizobium*; V — 40N + *Rhizobium*; VI — 80N + *Rhizobium*.

Опыт 2: I — контроль; II — 20N; III — *Rhizobium*; IV — 20N + *Rhizobium*; V — 20N + *Rhizobium* + *Klebsiella*; VI — 20N + *Rhizobium* + *Pseudomonas*.

Опыты проводились в 6-кратной повторности на дерново-подзолистой легкосуглинистой почве: рН_{кон} 6,2, содержание гумуса —

1,8%, подвижного фосфора — 20,5 мг, обменного калия — 19,0 мг/100 г.

Растения выращивали в сосудах Митчерлиха, куда помещали по 1,5 кг воздушно-сухой почвы, на которую высевали по 8 предварительно пророщенных семян. После появления всходов в сосудах оставляли по 5 растений.

Азотное удобрение — сульфат аммония (¹⁵NH₄)₂SO₄ с 90,2% содержанием ¹⁵N — вносили в виде водного раствора.

Штаммы бактерий *Rhizobium leguminosarum* Pis 4 и *Pseudomonas* sp. PsIA₁₂ были любезно предоставлены Институтом экофизиологии первичной продукции г. Мюнхенберга (Германия). Штамм бактерий *Klebsiella planticola* ТСХА-91 получен на кафедре микробиологии Тимирязевской академии.

Микроорганизмы вносили в виде торфяных препаратов, содержащих 10⁹ клеток на 1 г, из расчета 1 г торфяного препарата на 50 семян гороха.

По окончании эксперимента определяли урожай бобов, листьев и корневой массы гороха, а также вынос азота данными частями растения. Содержание общего азота в растениях определяли по методу Кьельдаля.

Обработку результатов анализа проводили методом дисперсионного анализа (1а).

Результаты и их обсуждение

Как видно из табл. 1, даже «стартовая» доза 20N (обычно применяемая в практике научных исследований и в производстве и обеспечивающая рост бобового

растения до заражения *Rhizobium* и установления симбиотического процесса) отрицательно сказалась на урожае бобов. Негативный эффект наблюдался также и при дозах 40N и 80N. Это объясняется ингибирующим влиянием минерального азота на *Rhizobium*, внесенных под горох. Правда, повышенные дозы азота способствовали увеличению общей би-

омассы гороха, но это было вызвано одним лишь действием минеральных удобрений, поскольку функционирование *Rhizobium* оказалось депрессировано. Следует также обратить внимание на одну важную деталь, выявленную в данном опыте, — это торможение роста корневой системы гороха под воздействием повышенных доз минерального азота.

Таблица 1

Сухая масса (г/сосуд) растений при инокуляции гороха симбиотическими бактериями *Rhizobium* и ассоциативными diaзотрофами *Klebsiella* и *Pseudomonas* в вариантах с разными дозами азота. Опыт 1.

Вариант	Листья	Семена	Бобы	Надземная часть	Корни	Общая масса растений
Контроль	1,07	1,13	0,59	2,79	0,61	3,40
20N	1,44	1,49	0,73	3,66	0,88	4,54
<i>Rhizobium leguminosarum</i>	1,43	1,56	0,52	3,51	0,89	4,40
20N + <i>Rhizobium leguminosarum</i>	1,35	1,31	0,69	3,35	0,85	4,20
40N + <i>Rhizobium leguminosarum</i>	1,64	1,38	0,64	3,66	0,83	4,49
80N + <i>Rhizobium leguminosarum</i>	1,67	1,32	0,73	3,72	0,90	4,62
HCP ₀₅	0,12	0,20	0,21	0,30	0,11	0,38

Полученные нами данные еще раз поставили вопрос о необходимости дальнейших исследований для разработки новых микробиологических способов повышения урожайности бобовых, которые позволили бы не применять повышенных доз минерального азота, с использованием не только высокоэффективных штаммов *Rhizobium*, но и других микроорганизмов, обладающих способностью как к азотфиксации, так и к биосинтезу ростовых веществ и антибиотиков. В связи с этим нами был

поставлен второй вегетационный опыт, в котором горох выращивали на фоне 20N, но с применением комплексной инокуляции растений *Rhizobium leguminosarum* штамм Pis 4 и ассоциативных бактерий — *Klebsiella planticola* штамм TCXA-91 и *Pseudomonas* sp. штамм PsIA₁₂, обладающих не только нитрогеназной активностью, но и способностью продуцировать ростовые вещества и антибиотики [2].

Из табл. 2 следует, что комплексная инокуляция растений гороха обеспечивала более высокий

урожаем семян, чем инокуляция одним *Rhizobium*. При этом существенно увеличивалась общая фитомасса растений гороха, в том числе и масса корней. Таким образом, данный прием способствует лучшему снабжению растений азотом, а также обуславливает ростовой эффект благодаря способности используемых бактерий

к биосинтезу фитогормонов. Здесь необходимо также отметить особо интересный факт, что эффект от применения комплекса симбиотических и ассоциативных бактерий под бобовые растения существенно (почти в 2 раза) превышает действие достаточно высокой дозы минерального азота (80 кг/га).

Т а б л и ц а 2

Сухая масса (г/сосуд) растений при комплексной инокуляции гороха симбиотическими бактериями и ассоциативными diaзотрофами на фоне «стартовой» дозы азота (20N) в опыте 2

Вариант	Листья	Семена	Бобы	Надземная часть	Корни	Общая масса растений
Контроль	1,07	1,13	0,59	2,79	0,61	3,40
20N	1,44	1,49	0,73	3,66	0,88	4,54
<i>Rhizobium leguminosarum</i>	1,43	1,56	0,52	3,51	0,89	4,40
20N + <i>Rhizobium leguminosarum</i>	1,35	1,31	0,69	3,35	0,85	4,20
20N + <i>Rhizobium leguminosarum</i> + <i>Klebsiella planticola</i>	1,69	2,05	0,59	4,33	1,04	5,37
20N + <i>Rhizobium leguminosarum</i> + <i>Pseudomonas sp.</i>	1,91	2,35	0,65	4,91	1,03	5,94
HCP ₀₅	0,12	0,20	0,21	0,30	0,11	0,38

Это имеет большое экологическое значение при рассмотрении вопросов качества сельскохозяйственной продукции и охраны природы, так как применение бактериальных культур позволяет выращивать продукцию с минимальным нитратным загрязнением, а также щадящим воздействием на окружающую среду.

В связи с результатами опытов, показавших негативное воздействие повышенных доз минерального азота на эффективность инокуляции гороха *Rhizobium*, пред-

ставлялось важным определить значимость разных доз азота в выносе из почвы этого элемента растениями, инокулированными симбиотическими *Rhizobium* и ассоциативными diaзотрофами *Klebsiella* и *Pseudomonas*.

Данные табл. 3 показывают, что применение симбиотических бактерий *Rhizobium* способствует увеличению выноса азота растениями гороха, главным образом семенами. Так, если в контроле вынос азота семенами гороха равнялся 40,3 мг/сосуд, то при

инокуляции *Rhizobium* — 56,8 мг/сосуд. В то же время внесение азота в дозе 20 кг/га несколько понизило, а повышенные его дозы (40 и 80 кг/га) увеличили, но весьма незначительно, вынос азота семенами инокулированного *Rhizo-*

bium гороха. Так, если инокуляция *Rhizobium* способствовала выносу 56,8 мг азота на сосуд, то при внесении 20N по фону инокуляции вынос составил 53,2 мг/сосуд, а при 40N и 80N — соответственно 57,5 и 58,9 мг/сосуд.

Т а б л и ц а 3

Вынос азота (мг/сосуд) растениями при инокуляции гороха симбиотическими бактериями *Rhizobium* в вариантах с разными дозами азота. Опыт 1.

Вариант	Листья	Семена	Бобы	Надземная часть	Корни	Общая масса растений
Контроль	20,54	40,29	11,56	72,39	10,44	82,82
20N	26,44	54,99	14,88	96,31	12,76	109,07
<i>Rhizobium leguminosarum</i>	27,69	56,80	10,62	95,11	14,67	109,78
20N + <i>Rhizobium leguminosarum</i>	31,52	53,24	18,05	102,81	16,42	119,23
40N + <i>Rhizobium leguminosarum</i>	37,51	57,49	19,25	114,25	14,30	128,56
80N + <i>Rhizobium leguminosarum</i>	41,42	58,98	27,07	127,47	22,38	149,86
НСР ₀₅	2,52	7,71	5,19	6,07	2,02	10,63

Следовательно, мы наблюдаем снижение эффективности приема нитрагинизации бобовых при внесении минерального азота. Правда, повышенные его дозы обеспечили увеличение выноса этого элемента надземной частью гороха, главным образом, листьями и бобами, а также корнями.

Полученные результаты поставили вопрос о значимости комплексной инокуляции гороха как симбиотическими, так и ассоциативными бактериями в выносе азота растениями.

Как видно из табл. 3 и 4, увеличение выноса азота горохом происходило не только под влиянием *Rhizobium leguminosarum*, но особенно при совместном действии *Rhizobium* и *Klebsiella*, а так-

же *Rhizobium* и *Pseudomonas* (на фоне 20N). Добавление дiazотрофов *Klebsiella* и *Pseudomonas* к *Rhizobium* позволило увеличить общий вынос азота растениями соответственно на 39,8 и 59,3 мг/сосуд при 119,2 мг/сосуд в варианте 20N + *Rhizobium*, т.е. эффект от применения бактерий *Klebsiella* и *Pseudomonas* совместно с *Rhizobium* на фоне 20N был даже больше, чем от 80N + *Rhizobium*.

Представленные данные показывают, что повышенные дозы минерального азота не сказываются существенным образом не только на урожае семян гороха, но и на выносе азота растениями из почвы. При этом эффективность инокуляции растений *Rhizobium* несколько снижалась. В то

Вынос азота (мг/сосуд) растениями при инокулировании гороха симбиотическими бактериями и ассоциативными diaзотрофами на фоне «стартовой» дозы азота (20N) в опыте 2

Вариант	Листья	Семена	Бобы	Надземная часть	Корни	Общая масса растений
Контроль	20,54	40,29	11,56	72,39	10,44	82,82
20N	26,44	54,99	14,88	96,31	12,76	109,07
Rhizobium leguminosarum	27,69	56,80	10,62	95,11	14,67	109,78
20N + Rhizobium leguminosarum	31,52	53,24	18,05	102,81	16,42	119,23
20N + Rhizobium leguminosarum + Klebsiella planticola	39,90	84,05	14,11	138,06	21,01	159,07
20N + Rhizobium leguminosarum + Pseudomonas sp.	45,21	97,04	15,69	157,94	20,60	178,54
НСР ₀₅	2,52	7,71	5,19	6,07	2,02	10,63

же время комплексная инокуляция гороха *Rhizobium* и ассоциативными diaзотрофами *Klebsiella* и *Pseudomonas* способствовала лучшему использованию почвенного азота, а также азота атмосферы растениями гороха и, как следствие, увеличению выноса с урожаем этого важного для растений элемента.

Выводы

1. Повышенные дозы азотных минеральных удобрений (40—80 кг/га) существенно (в 1,6—1,7 раза) снижают продуктивность инокуляции гороха симбиотическими бактериями рода *Rhizobium*. Использование повышенных доз минерального азота под бобовые (в частности, под горох), инокулированные *Rhizobium*, не представляется целесообразным приемом.

2. Впервые установлена высокая эффективность инокуляции горо-

ха комплексом симбиотических бактерий *Rhizobium leguminosarum* и ассоциативных diaзотрофов *Klebsiella planticola* и *Pseudomonas sp.* Выявлено, что эффективность комплексной инокуляции указанными бактериями почти в 2 раза выше, чем действие достаточно высокой дозы минерального азота (80 кг/га), что обусловлено синергическим эффектом внесенных микроорганизмов: снабжением растений азотом, ростовыми веществами и фитосанитарной защитой.

3. Показано, что повышенные дозы азотных минеральных удобрений не сказались существенным образом не только на урожае гороха, но и на выносе азота растениями из почвы. При этом эффективность инокуляции *Rhizobium* несколько снизилась. В то же время комплексная инокуляция гороха симбиотическими бактериями *Rhizobium leguminosarum* и ассо-

циативными дiazотрофами *Klebsiella planticola* и *Pseudomonas* sp. способствовала лучшему использованию почвенного азота, а также азота атмосферы растениями гороха, что обусловило повышение их урожайности и, как следствие, увеличение выноса азота с урожаем.

4. Предлагаемая нами комплексная инокуляция бобовых культур симбиотическими бактериями *Rhizobium leguminosarum* и ассоциативными дiazотрофами *Klebsiella planticola* и *Pseudomonas* sp. представляет собой новое, весьма перспективное направление в сельскохозяйственной биотехнологии, которое должно иметь большую практическую значимость в деле биокоррекции загрязненной почвенной среды и обеспечения производства экологически чистой продукции.

5. Совместное применение симбиотических *Rhizobium leguminosarum* и ассоциативных азотфиксаторов *Klebsiella planticola* и *Pseudomonas* sp. позволяет значительно снизить дозы минеральных азотных удобрений или полностью отказаться от них.

6. Использование данных препаратов в практике сельскохозяйственного производства очень важно с точки зрения охраны окружающей среды, снижения пестицидной нагрузки и выращивания экологически безопасной продукции.

ЛИТЕРАТУРА

1. Демолон А. Рост и развитие культурных растений. М.: Госизд-во с.-х. лит.-ры, 1961. — 2. Емцев В.Т., Селицкая О.В., Кубарева

О.Г., Петров—Спирidonов А.А., Брук М.Х., Захарова С.Н. Ассоциативный симбиоз и его роль в продуктивности с.-х. растений. — Сб.: Тимирязев и биологическая наука. М.: МСХА, 1994, с. 106—119. — 3. Калининская Т.А., Миллер Ю.М., Белов Ю.М., Рао В.П. Изучение с помощью ^{15}N активности несимбиотической азотфиксации в почвах рисовых полей Краснодарского края. — Изв. АН СССР. Сер. биол. наук, 1977, № 4, с. 565—570. — 4. Козлов И.В. О влиянии связанных соединений азота на азотфиксирующую активность клубеньковых бактерий. — Вест. с.-х. науки, 1962, № 2, с. 49—54. — 5. Лапинская Э.В. Влияние сочетания инокуляции клубеньковыми бактериями и минерального азота на урожай клевера красного и ячменя (в последствии). — Бюл. ВНИИСельхозмикробиологии, 1978, № 19, вып. 2, с. 24—27. — 6. Мишустин Е.Н., Черепков Н.И. Значение биологического азота в азотном балансе и повышении плодородия почв СССР. — В кн.: Биолог. азот в сельск. хоз-ве СССР. М.: Наука, 1989, с. 3—7. — 7. Мишустин Е.Н., Шильникова В.К. Клубеньковые бактерии и инокуляционный процесс. М.: Наука, 1973, с. 65—83. — 8. Моторин И.И. Влияние минеральных удобрений на урожай люцерны. — В сб.: Вопр. химизации земледелия. Иркутск, 1972, с. 83—88. — 9. Новогрудская Е.Д., Меметова Л.Ш. Получение и применение микробиологических средств защиты растений, кормовых антибиотиков и бактериальных удобрений. — Обзорная информ., 1987, вып. 3. — 10.

Посытанов Г.С. Биологический азот. Проблемы экологии и растительного белка. М.: Изд-во МСХА, 1993. — 11. *Посытанов Г.С., Воронкова Т.В.* Азотное питание клевера красного при естественном увлажнении и орошении. — В сб.: Биол. основы повышения урожайности с.-х. культур. М.: Россельхозиздат, 1981, с. 11—15. — 12. *Тюрин П.В.* Плодородие почв и проблема азота в почвоведении и земледелии. Совещ. по вопр. эффект. способов использования удобрений. М.: Изд-во МСХ СССР, 1957. — 13. *Федоров М.В., Подъяпольская В.П.* Влияние условий выращивания бобовых растений на образование клубеньков и урожай растений. — Докл. АН СССР, 1951, т. 77, № 1, с. 121. — 14. *Човжик А.Д., Треначев Е.П.* Исследование дей-

ствия возрастающих доз минеральных удобрений на продуктивность многолетних трав и последующих культур севооборота на дерново-подзолистой почве. Сообщ. 2. — *Агрохимия*, 1982, № 3, с. 84—94. — 15. *Atlas R.M.* Microbiology Fundamental and Application. N.V.: Macmillan Publishing Co., 1984. — 16. *Dazzo F.B., Brill W.I.* — *Plant Physiol.*, 1978, vol. 62, N 1, p. 18—21. — 17. *Lie T.A., Herio D., Lambers R., Houwerst A.* — Symbiotic nitrogen fixation in plants. / Ed. P.S. Nutman. Cambridge: Univ. press, 1976, p. 319—333. — 18. *Okon A.* — *Trends Biotechnol.*, 1985, vol. 3, N 9, p. 223—228. — 19. *Postgate I.* — *Ins. Biol. Stud. Biol.*, 1978, N 92, p. 1—671. — 20. *Watanabe L., App A., Alexander M.* — *Soil Sci*, 1980, vol. 130, N 5, p. 281—290.

Статья поступила 21 марта 1997 г.

SUMMARY

The effect of symbiotic *Rhizobium* and associative *Pseudomonas* and *Klebsiella* diazotrophs on yield and removal of nitrogen by plants depending on doses of mineral nitrogen has been studied, pea being used as illustration.

Investigations were conducted on soddy-podzolic slightly loam soil in greenhouse experiments at gumboldt University (Berlin).

Beneficial effect on diazotroph plants has been established, especially with combined application of symbiotic and associative microorganisms, their effect being almost 2 times higher than that of high enough dose of mineral nitrogen (80 kg/ha). Effect of nitrification gets lower with application of mineral nitrogen.

The results obtained may be used in solving the problems of environment protection and of saving material resources.